

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-207827

(43)Date of publication of application : 20.08.1993

---

(51)Int.Cl.

A01H 1/00  
C12N 5/10  
C12N 13/00  
C12N 15/87

---

(21)Application number : 03-307168

(71)Applicant : SAPPORO BREWERIES LTD

(22)Date of filing : 28.10.1991

(72)Inventor : KANEKO TAKASHI  
ITO KAZUTOSHI

---

(30)Priority

Priority number : 40229358    Priority date : 01.11.1990    Priority country : JP

---

### (54) PRODUCTION OF TRANSFORMED PLANT

(57)Abstract:

PURPOSE: To remarkably reduce the transforming operation by transducing a genetic substance through holes formed with laser pulses into a pollinical cell in a stage just before starting the division or during the initial division in a process for culturing an anther of the pollinical cell enclosed in the anther of a gramineous plant.

CONSTITUTION: In a process for culturing an anther in the mid uninucleate stage microspores enclosed in the anther of a gramineous plant, a genetic substance is transduced through holes formed with laser pulses into the pollinical cell in a stage just before starting the division or during the initial division and the genetic information on the genetic substance is expressed to afford the objective transformed gramineous plant. Furthermore, barley is preferred as the gramineous plant.

---

### LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of  
rejection]

[Kind of final disposal of application other than  
the examiner's decision of rejection or  
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

**\* NOTICES \***

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

---

[Claim(s)]

[Claim 1] The manufacture approach of the Poaceae transformation vegetation characterized by making the gene matter introduce into the pollen cell concerned through the hole formed of the laser pulse , and making it discover the gene information of the gene matter concerned in the phase under initial fission in the anther culture process of the pollen cell in the middle of 1 nucleus term connoted by the anther of a grass just before starting fission .

[Claim 2] The manufacture approach of the Poaceae transformation vegetation according to claim 1 that grasses are wheat.

[Claim 3] The manufacture approach of the Poaceae transformation vegetation according to claim 2 that wheat is barleies.

[Claim 4] The grass transformation approach characterized by making the gene matter introduce into the pollen cell concerned in the phase under initial fission through the hole formed of the laser pulse in the anther culture process of the pollen cell in the middle of 1 nucleus term connoted by the anther of a grass just before starting fission.

[Claim 5] In the anther culture process of the pollen cell in the middle of 1 nucleus term connoted by the anther of a grass, just before starting fission, in the phase under initial fission The gene matter is made to introduce into the pollen cell concerned through the hole formed of the laser pulse. The manufacture approach of the Poaceae transformation vegetation characterized by choosing the cell which discovers the gene information of the gene matter concerned, cultivating this selected cell by the callus inducer medium, making a callus and/or an embryoid body form, planting in a redifferentiation culture medium after that, obtaining a splice and a plant body, and checking a transformation.

---

[Translation done.]

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **05207827 A**

(43) Date of publication of application: **20.08.93**

(51) Int. Cl.

**A01H 1/00**

**C12N 5/10**

**C12N 13/00**

**C12N 15/87**

(21) Application number: **03307168**

(22) Date of filing: **28.10.91**

(30) Priority: **01.11.90 JP 40229358**

(71) Applicant: **SAPPORO BREWERIES LTD**

(72) Inventor: **KANEKO TAKASHI  
ITO KAZUTOSHI**

**(54) PRODUCTION OF TRANSFORMED PLANT**

**(57) Abstract:**

PURPOSE: To remarkably reduce the transforming operation by transducing a genetic substance through holes formed with laser pulses into a pollinical cell in a stage just before starting the division or during the initial division in a process for culturing an anther of the pollinical cell enclosed in the anther of a gramineous plant.

CONSTITUTION: In a process for culturing an anther in the mid uninucleate stage microspores enclosed in the anther of a gramineous plant, a genetic substance is transduced through holes formed with laser pulses into the pollinical cell in a stage just before starting the division or during the initial division and the genetic information on the genetic substance is expressed to afford the objective transformed gramineous plant. Furthermore, barley is preferred as the gramineous plant.

COPYRIGHT: (C)1993,JPO&Japio

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-207827

(43) 公開日 平成5年(1993)8月20日

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A01H 1/00	A	8502-2B		
C12N 5/10				
13/00		2121-4B		
		7236-4B	C12N 5/00	C
		8931-4B	15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数5 (全5頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平3-307168	(71) 出願人	000002196 サッポロビール株式会社 東京都中央区銀座7丁目10番1号
(22) 出願日	平成3年(1991)10月28日	(72) 発明者	金子 隆史 群馬県新田郡新田町木崎37-1 サッポロ ビール株式会社植物工学研究所内
(31) 優先権主張番号	特願平2-293582	(72) 発明者	伊藤 一敏 群馬県新田郡新田町木崎37-1 サッポロ ビール株式会社植物工学研究所内
(32) 優先日	平2(1990)11月1日	(74) 代理人	弁理士 久保田 藤郎
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

(54) 【発明の名称】 形質転換植物の製造方法

(57) 【要約】 (修正有)

【構成】 イネ科植物の葯に内包される一核期中期の花粉細胞の葯培養過程において、分裂を開始する直前または初期分裂中の段階で、当該花粉細胞にレーザーパルスにより形成された孔を経て遺伝子物質を導入せしめ、当該遺伝子物質の遺伝子情報を発現せしめることを特徴とするイネ科形質転換植物の製造方法並びにイネ科植物の葯に内包される一核期中期の花粉細胞の葯培養過程において、分裂を開始する直前または初期分裂中の段階で、当該花粉細胞に、レーザーパルスにより形成された孔を経て遺伝子物質を導入せしめることを特徴とするイネ科植物形質転換方法。

【効果】 本発明によれば、プロトプラストを調製する必要がないので、形質転換の時間と作業を大幅に削減できる。また、半数体細胞を形質転換するので、後代に分離することなく導入形質が伝達する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 イネ科植物の薬に内包される一核期中期の花粉細胞の薬培養過程において、分裂を開始する直前または初期分裂中の段階で、当該花粉細胞に、レーザーパルスにより形成された孔を経て遺伝子物質を導入せしめ、当該遺伝子物質の遺伝子情報を発現せしめることを特徴とするイネ科形質転換植物の製造方法。

【請求項2】 イネ科植物が、ムギ類である請求項1記載のイネ科形質転換植物の製造方法。

【請求項3】 ムギ類が、オオムギである請求項2記載のイネ科形質転換植物の製造方法。

【請求項4】 イネ科植物の薬に内包される一核期中期の花粉細胞の薬培養過程において、分裂を開始する直前または初期分裂中の段階で、当該花粉細胞に、レーザーパルスにより形成された孔を経て遺伝子物質を導入せしめることを特徴とするイネ科植物形質転換方法。

【請求項5】 イネ科植物の薬に内包される一核期中期の花粉細胞の薬培養過程において、分裂を開始する直前または初期分裂中の段階で、当該花粉細胞に、レーザーパルスにより形成された孔を経て遺伝子物質を導入せしめ、当該遺伝子物質の遺伝子情報を発現する細胞を選択し、この選択された細胞をカルス誘導培地で培養し、カルスおよび／または胚様体を形成せしめ、その後再分化培地に植え継ぎ、植物体を得、形質転換を確認することを特徴とするイネ科形質転換植物の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はイネ科形質転換植物の製造方法およびイネ科植物形質転換方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】 植物の形質転換法として、アグロバクテリウムを利用した遺伝子導入方法が確立されているが、アグロバクテリウムはオオムギを含む禾本科植物には感染することが出来ず、他の方法が試みられている。

【0003】 それらの方法として、ベクターDNAの直接導入の方法が検討されている。例えば、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法、ポリエチレングリコール法あるいはマイクロインジェクション法を用いて形質転換する方法、即ちトウモロコシ「Nature, 319 巻, 791(1986)」、イネ「Mol. Gen. Genet., 204 巻, 204(1986)」、ムギ「Mol. Gen. Genet., 199 巻, 178(1985)」および牧草「Mol. Gen. Genet., 199 巻, 178(1985)」で植物細胞への遺伝子導入が可能であることが報告されている。

【0004】 しかし、パーティクルガン法、マイクロインジェクション法といった物理的に遺伝子を細胞に移入する方法では、処理効率の低さやキメラ形質転換植物の発生などの問題がある。

【0005】 さらに、エレクトロポレーションによるイ

ネ科植物への遺伝子導入系を使う形質転換植物の製造法「特開平1-181791号公報」やポリエチレングリコール法などプロトプラストを介する方法が報告されているが、多くのムギ類ではプロトプラストから植物体に至る系が確立されていない。また、プロトプラストの調製に多くの選抜培養と長い期間が必要で、さらにプロトプラスト培養は同一の作物であっても一部の培養特性の優れた品種、系統にしか適用できないのが現状である。

【0006】 レーザーパルスにより形質転換する方法としては現在のところ、動物細胞の形質転換に用いられており、植物組織およびその細胞については予備的な実験への使用に留まり「Weber等、Plant Cell Tissue and Organ Culture, 12巻, 219(1988)」、またオルガネラについての実験「西ドイツ特許出願第3707111A公報」においても使用されているが、上記の方法によって植物の花粉を形質転換することは知られていない。また、トウモロコシ胚へのレーザーによる遺伝子導入系を使う形質転換植物の製造法が報告されている「特開平2-9378号公報」が、この方法により得られる形質転換体はキメラであり、オオムギ等のムギ類でホモ体の形質転換体を得る方法は未だ確立されていない。上述の如く、植物体の形質転換は種々試みられてはいるが、単子葉植物、特にイネ科植物において長らく強い要望があるにも拘らず成し得ていなかった。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は上記課題を克服すべく、鋭意検討を重ねた結果、イネ科植物の花粉に外来遺伝子を効率よく導入し、形質転換されたイネ科植物を製造する方法を見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】 即ち本発明は、イネ科植物の薬に内包される一核期中期の花粉細胞の薬培養過程において、分裂を開始する直前または初期分裂中の段階で、当該花粉細胞にレーザーパルスにより形成された孔を経て遺伝子物質を導入せしめ、当該遺伝子物質の遺伝子情報を発現せしめることを特徴とするイネ科形質転換植物の製造方法並びにイネ科植物の薬に内包される一核期中期の花粉細胞の薬培養過程において、分裂を開始する直前または初期分裂中の段階で、当該花粉細胞にレーザーパルスにより形成された孔を経て遺伝子物質を導入せしめることを特徴とするイネ科植物形質転換方法を提供するものである。以下、本発明を詳細に説明する。

【0009】 本発明の方法は、通常薬に内包される一核期中期の花粉細胞の薬培養過程において、分裂を開始する直前または初期分裂中の段階で、適当な花粉細胞を、導入したい遺伝情報を有する遺伝子物質を含有する溶液、典型的には水溶液中に懸濁させることにより行い得る。次いで、レーザー装置の焦点を当該花粉細胞の一つに合わせ、そしてレーザーを照射して細胞壁中に孔を形成させ、この孔を通じて遺伝子物質を細胞内に導入す

る。この細胞をカルス誘導培地で培養し、カルスおよび／または胚様体を形成せしめ、その後再分化培地に植え継ぎ、形質転換を確認し、形質転換植物を得ることができる。

【0010】イネ科植物の葯をカルス誘導培地で培養し、内包される一核期中期の花粉が培養細胞として分裂を開始する直前または初期分裂中の段階で、適当な花粉細胞を培養する方法は、葯を改変MS培地「Carlsberg Res. Commun. 52巻, 393(1987)」、FHG培地「Kasha 等, XIX Stadler Genetics Symp. 213(1989)」、Clapham I, II, III 培地「Z. Pflanzenzucht, 69巻, 142(1973)」、Foroughi-Weir等の培地「Z. Pflanzenzucht, 77巻, 198(1976)」およびそれらの培地の変法培地等の培地より培養する葯の特性に基づいて選定した培地中で培養する。培養温度は、培養する葯によるが、通常22～28℃、好ましくは25℃付近であり、培養時のpHは、通常5.6～6.0、好ましくは5.8であり、培養期間は、培養する葯によるが、通常0～14日間である。レーザー処理は、花粉細胞が分裂し、カルス誘導培地中にDNAを複製する能力を獲得したとき、即ち花粉細胞が形態的に細胞質リッチの細胞に変化したときに実施すべきである。一般に、花粉細胞は2週間以内にレーザー処理に適した細胞に変わる。

【0011】また、Ziauddin等の方法「Plant Cell Reports, 9巻, 59(1990)」により得られた花粉細胞を用いても良い。ここで用いられるイネ科植物は、イネ、トウモロコシ、ムギ類等が挙げられ、ムギ類としては、オオムギ、コムギ、ライムギ、オーツムギ、ライコムギ等が挙げられ、オオムギとしてはDissa, Igri, TRUMPF, CARINA, はるな二条等が挙げられる。これらの植物から常法にしたがって葯を採取すればよい。また、用いられる当該花粉細胞は、葯から単離された一核期中期のものが挙げられる。

【0012】遺伝情報を有する遺伝子物質は、イネ科植物でその遺伝情報を安定化せしめ、その遺伝情報を発現するように制御されたものであり、具体的にはイネ科植物で機能するプラスミドが挙げられ、例えばイネ科植物で機能するプロモーターとしてCaMV35S, CaMV19S等のカリフラワーモザイクウイルス由来のプロモーター、PR蛋白プロモーター、ADH-1プロモーター等、ターミネーターとしてCaMV35S, CaMV19S, NOS等のターミネーター、形質転換特性として所望の除草剤耐性遺伝子、BT毒素、プロテアーゼインヒビター等の昆虫抵抗性遺伝子、ウイルス抵抗性遺伝子、ゼイン、グルテニン等の貯蔵蛋白遺伝子、Ac, Da等の転移因子遺伝子等の外来遺伝子等を有する。さらに、初期選択マーカーとして薬剤耐性遺伝子を有してもよい。

【0013】当該遺伝子物質を含有する溶液は、細胞中に導入することを希望する遺伝子約10～20,000μ

g/mlと他成分、具体的には正確な浸透圧の平衡化または高張化を促進するための不活性塩類、細胞栄養物または他の添加剤を有するものである。より具体的に例示すると、9～15%のマンニトールを含有する遺伝子懸濁液を挙げることができる。

【0014】次に、レーザー装置の焦点を当該花粉細胞の一つに合わせ、そしてレーザーを照射して細胞壁中に孔を形成させ、この孔を通じて遺伝子物質を細胞内に導入するわけであるが、孔の寸法は変動させ得るが、細胞の寸法と比較して余り大きいものであってはならない。具体的には通常5～500nmの直径を有する孔を形成せしめる。パルスの印加時間は通常5～20ナノ秒であり、好ましくは10～15ナノ秒である。パルスエネルギーは、通常0.1～10マイクロジュール(μJ)の範囲に調整する。用いられるレーザー装置は、原則的には適度に微小な焦点にレーザーを集中することができる任意の装置を使用しうる。好適には、既に哺乳動物細胞のレーザーマイクロインジェクションに利用可能な装置として市販されている日立製作所製の日立レーザーセルプロセッサが挙げられる。

【0015】レーザー処理を行った後、遺伝子物質をその溶液から穿孔後の花粉細胞中に拡散、侵入させるのに十分な時間、当該花粉細胞を当該遺伝子物質を含有する溶液中で、インキュベートする。インキュベート時間は、通常5秒～2時間であり、インキュベーションの温度は、通常0～28℃である。

【0016】上述の如くして行われたレーザー処理とインキュベーションを行った後、得られた花粉細胞またはこれから誘導された細胞を培養して植物体を生ぜしめる。本発明の好ましい態様として、Olsen等の方法「Carlsberg Res. Commun. 52巻, 393(1987)」、Ziauddin等の方法「Plant Cell Reports, 9巻, 59(1990)」が挙げられる。さらに、好ましい態様としてナース細胞の利用を挙げることができる。

【0017】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明を説明するが、これらは何等本発明を限定するものではない。

#### 実施例1

オオムギ cv Dissa 播種後、12℃-明-16時間、10℃-暗-8時間で生育せしめ、花粉一核期中期(mid uninucleate stage microspores)の葯を改変MS+Ficoll培地に植え付け、25度-2週間培養後、ピンセット及び薬匙で葯を裂開し、花粉細胞をDNA溶液中に流しだす。10～20個の葯を1ml溶液に取り、96μmφナイロンメッシュでカルスと夾雑物を除いて分裂を開始する直前の培養細胞を遠心分離(1000rpm×5min)で20～100μlに濃縮回収し、レーザー処理サンプルとする。

【0018】用いるDNA溶液はOkada 溶液+15%マンニトール+pBI221〔東洋紡績株式会社販売〕10μg/

ml+pSBG102(Hm') [上記pBI221のBamHI, PstI サイトに囲まれた $\beta$ -グルクロニダーゼ構造遺伝子をハイグロマイシンBフォスフォトランスフェラーゼ構造遺伝子「Gene, 25巻, 179(1983)」に置き換えたもの]  $10\mu\text{g}/\text{ml}$ +Calf Thymus DNA  $50\mu\text{g}/\text{ml}$ である。

【0019】シャーレ上にこの液滴を置き、乾燥を防ぐために5mm角の1%アガロース片をのせ、シャーレに蓋をしてフィルムで巻き、日立レーザー セル プロセッサにセットした。このサンプルは花粉細胞、発生した単細胞および分裂を開始した細胞塊を含有している。細胞質リッチの発生単細胞を選び、 $0.4\mu\text{J}$ のエネルギーでレーザーパルス穿孔した。

5mg X-glu in deoxydized DMF(dimethyl formamide)

↓

solute in 5ml 50mM K.P.buffer (カリウムリン酸バッファー) [pH7.0 終濃度 $1\text{mg}/\text{ml}$ ]

#### 【0022】GUS溶解バッファー

50mM K.P. buf pH7.0+10mM EDTA+0.1%Triton X 100+0.1% Sarkosyl +10mM 2-Mercaptoethanol

#### 【0023】細胞の調製

小さいコロニーや組織の表面を染色する場合は、そのまま液に浸せばよい。反応を定量的に、または正確に行わせる場合は、組織に少量のGUS溶解バッファーを加えて搾り潰し、基質を加える。1mmカルスではGUS溶解バッファー $20\mu\text{l}$ , X-glu溶液 $100\mu\text{l}$ でよい。

#### 【0024】実施例2

オオムギIgr i播種後、 $12^\circ\text{C}$ -明-16時間、 $10^\circ\text{C}$ -暗-8時間で生育させ、花粉一核期中期(mid uniu cleate stage microspores)の薬を得た。次いで、この薬を改変MS+Fico1培地に植え付け、 $25^\circ\text{C}$ で2週間培養後、ピンセット及び薬匙で薬を裂開し、花粉細胞をDNA溶液中に流しだす。 $10\sim 20$ 個の薬を1ml溶液に取り、 $96\mu\text{m}$ φナイロンメッシュでカルスと夾雑物を除いて初期分裂中の培養細胞を遠心分離( $1000\text{rpm}\times 5\text{min}$ )で $20\sim 100\mu\text{l}$ に濃縮回収し、レーザー パルス処理サンプルとした。

【0025】用いるDNA溶液はOkada 溶液+15%マンニトール+pBI221 [東洋紡績株式会社販売]  $10\mu\text{g}/\text{ml}$ +pSBG102(Hm') [上記pBI221のBamHI, PstI サイトに囲まれた $\beta$ -グルクロニダーゼ構造遺伝子をハイグロマイシンBフォスフォトランスフェラーゼ構造遺伝子「Gene, 25巻, 179(1983)」に置き換えたもの]  $10\mu\text{g}/\text{ml}$ +Calf Thymus DNA  $50\mu\text{g}/\text{ml}$ である。

【0026】シャーレ上にこの液滴を置き、乾燥を防ぐために5mm角の1%アガロース片をのせ、シャーレに蓋をしてフィルムで巻き、日立レーザー セル プロセッサにセットした。このサンプルを、 $0.4\mu\text{J}$ のエネルギー

【0020】処理後のサンプルは、 $100\sim 200\mu\text{l}$ の改変MS液体培地で希釈し、 $25^\circ\text{C}$ で静置培養した。2週間後に等量の培地(ハイグロマイシンB含有)を加えた。数ミリ径のカルスになったものについてGUS酵素の導入形質を調査した。その結果、約 $1/16$ の割合でGUS活性が認められた。以下にGUS活性の測定方法を示す。

#### 【0021】GUSアッセイの方法

##### ガス分析用染色液の処方

X-glu溶液(5-ブプロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-グルクロン酸)貯蔵溶媒

( $20\text{mg}/\text{ml}$  X-gluDMF)

ギーで自動的にレーザー穿孔する。

【0027】処理後のサンプルは、 $500\mu\text{l}$ の改変MS液体培地で希釈し、 $25^\circ\text{C}$ で静置培養した。2週間後に等量のハイグロマイシン選抜培地( $20\mu\text{g}/\text{ml}$ ハイグロマイシンB)を加えた。数ミリ径のカルスになったものについてGUS酵素またはハイグロマイシン耐性などの導入形質を調査した。その結果、処理細胞の約 $1/2000$ の割合でハイグロマイシン耐性が認められた。

#### 【0028】植物体への再分化

##### オオムギ形質転換植物の再分化

子葉に相当する葉原基を、ホルモンを除いた発根培地に移植して、同条件で培養することにより根の発達と地上部の生育を促し、ほぼ1ヶ月で完全な植物体が再分化した。その生葉よりCTAB法(Plant Molecular Biology Reporter 7:2, 1989)で核DNAを単離し、マーカー遺伝子の構造遺伝子部分の20mersをプライマーにして、PCR(Science 239巻, 487, 1988)を試みたところ、各々の遺伝子に値するDNAが合成された。このことから、核ゲノム中の外来遺伝子の存在が確認された。

#### 【0029】

【発明の効果】本発明を用いることにより、イネ科植物の培養細胞の形質転換を行うことができる。本発明によれば、プロトプラストを調製する必要がないので、形質転換の時間と作業を大幅に削減できる。また、半数体細胞を形質転換するので、後代に分離することなく導入形質が伝達する。しかも、品種、系統間の試験の難易度の差が少ないので、実用品種への応用が容易である。本発明の方法によれば、エレクトロポレーション法に比べて大きな穿孔が起こるので、分子量の大きなDNAや物質が導入できる。



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>

C 1 2 N 15/87

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所